

Techniques de Purification

Prof. Khaled MB





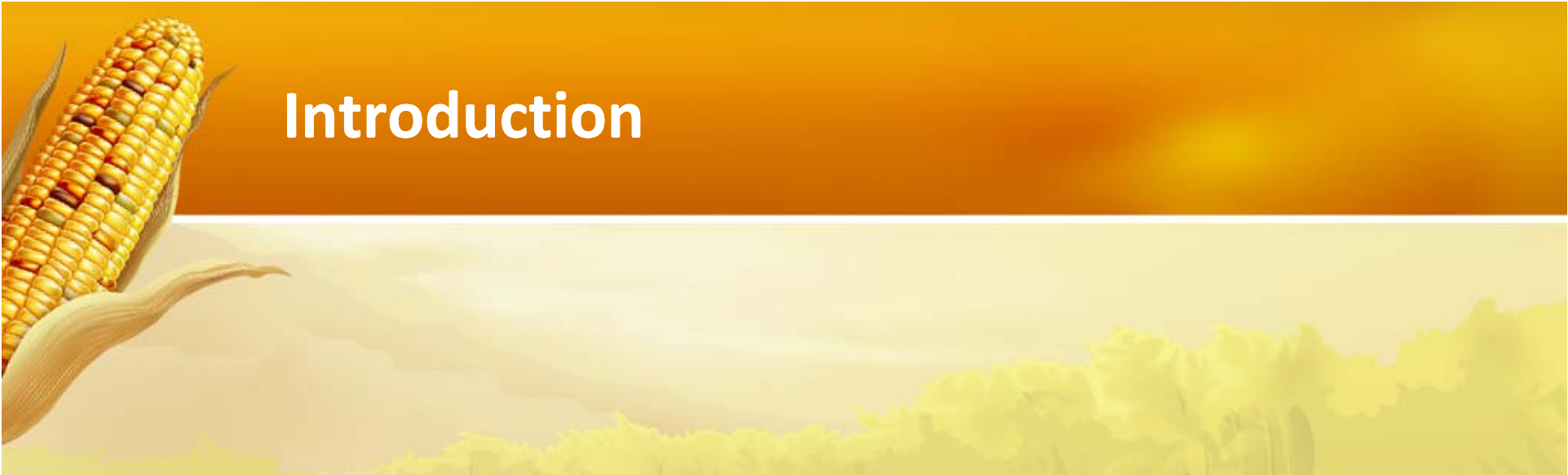
Introduction

L'enzyme à purifier est le plus souvent hydrosoluble et endocellulaire.

Une première étape « d'extraction » : à partir du matériel biologique permet d'obtenir un mélange de molécules solubles ou **extrait total**.

La rupture des membranes biologiques et des éventuelles parois cellulaires peut faire appel à divers procédés :

- **Mécaniques** : broyage – homogénéisation – broyage en présence d'abrasifs – congélations et décongélations successives – action des ultrasons.....
- **Chimiques** : utilisation des détergents non dénaturants.
- **Enzymatiques** : traitement au lysozymes pour les cellules bactériennes.



Introduction

Paramètres	Préparations enzymatiques	Enzymes purifiés
Pureté	Faible	Importante
Quantité produite par an	Dizaine de tonnes	Dizaine de kilogramme
Prix	Faible	Très élevé
Réaction enzymatique catalysée	Faible valeur ajoutée	Forte valeur ajoutée
Utilisation	Industrielle (agroalimentaire)	Pharmaceutique, analytique...



Introduction

- **Une deuxième étape « le fractionnement »** : permet d'éliminer les molécules non protéiques ainsi les acides nucléiques peuvent être éliminer par précipitation par différents composés (cationiques) et les protéines de propriété très différentes de l'enzyme recherché.
- Extractions sélectives et précipitation différentielles sont fréquemment employées. On obtient alors **l'extrait brut.**



Introduction

- **La dernière étape « la purification »** : proprement dite consiste à isoler l'enzyme recherché des autres protéines dont les propriétés physico-chimiques sont voisines. C'est l'étape la plus difficile. Elle est souvent longue et fait appel à la combinaison de différentes techniques de séparations des protéines (en fonction de leurs solubilités, de leurs polarités, de leurs charges, de leurs tailles ou de leurs affinités biologiques).

NB : Les méthodes utilisées dépendent des propriétés physico-chimiques de l'enzyme cherché et des protéines contaminantes.

Toutes les étapes doivent être réalisées dans des conditions non dénaturantes (basse température, milieux tamponisé, présence éventuelle d'agent protecteur).

Extraction





Extraction

L'extraction a pour objet de libérer les enzymes de cellules ou structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent. Il est donc nécessaire de détruire, selon le cas, la paroi, la membrane cellulaire et les structures subcellulaires par des procédés physiques ou chimiques suffisamment efficaces sans pourtant être trop dénaturantes. Cette extraction doit se faire à froid, en présence de substances protégeant l'activité enzymatique.

Il serait inutile de trop casser la paroi et les structures cellulaires car on risque d'augmenter le taux de contamination de l'extrait préparé. Ainsi on peut avoir intérêt à n'extraire que 50% de l'enzyme à condition qu'il soit peu contaminé ce qui simplifie et réduit le coût de purification.



Extraction

1. Utilisation d'abrasifs

Par agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les microorganismes par rupture de la paroi et libération des constituants cytoplasmiques.

2. Extraction par homogénéisation à haute pression

Une suspension de cellules est comprimée à haute pression puis décomprimée par passage à travers un trou de faible diamètre : cette décompression rapide provoque leur éclatement et la libération de leurs constituants.

N.B. La compression dégage de la chaleur ; donc il faut prévoir un système de refroidissement (circulation d'alcool à -25°C par exemple)



Extraction

3. Choc osmotique

Dans un milieu hypertonique (saccharose à 20%) dans de l'eau à 4°C provoque la libération de certains constituants cellulaires ; cette technique est très douce et ne dénature pas les protéines. Beaucoup de microorganismes résistent au choc osmotique : la seule utilisation concerne les Gram – tels *E. coli*. Il existe 3 limites :

- grands volumes à mettre en œuvre (400 dm³ pou 10kg de pâte)
- grand nombre d'étapes de centrifugation
- nécessité de maintenir une basse température.



Extraction

4. Traitement alcalin

Le TRT alcalin hydrolyse la membrane entre pH 11.5 et 12.5 ; ci cette technique est simple et peu coûteuse, elle n'est applicable que si l'enzyme est stable au pH alcalin au moins pendant 20 à 30 minutes (ex le cas de l'asparginase de *Ervinia chrysanthemi*)

5. Emploi de détergents

En se combinant aux lipoprotéines ils forment des micelle rendant la membrane perméable on peut constater une dénaturation des enzymes.



Extraction

6. Extraction par les solvants organiques

Utilisée à petite échelle, elle ne peut être à grande échelle à cause du coût du solvant (toluène par exemple), de sa toxicité, de la dénaturation des protéines et de son inflammabilité.

7. Lyse enzymatique

Le cas des lysozymes qui hydrolyse les liaisons α (1-4) glycosidiques des peptidoglycanes responsable de la rigidité des parois des bactéries Gram + et Gram -. Cette technique n'est utilisée qu'à petite échelle à cause des conditions opératoire et du coût du lysozyme.



Extraction

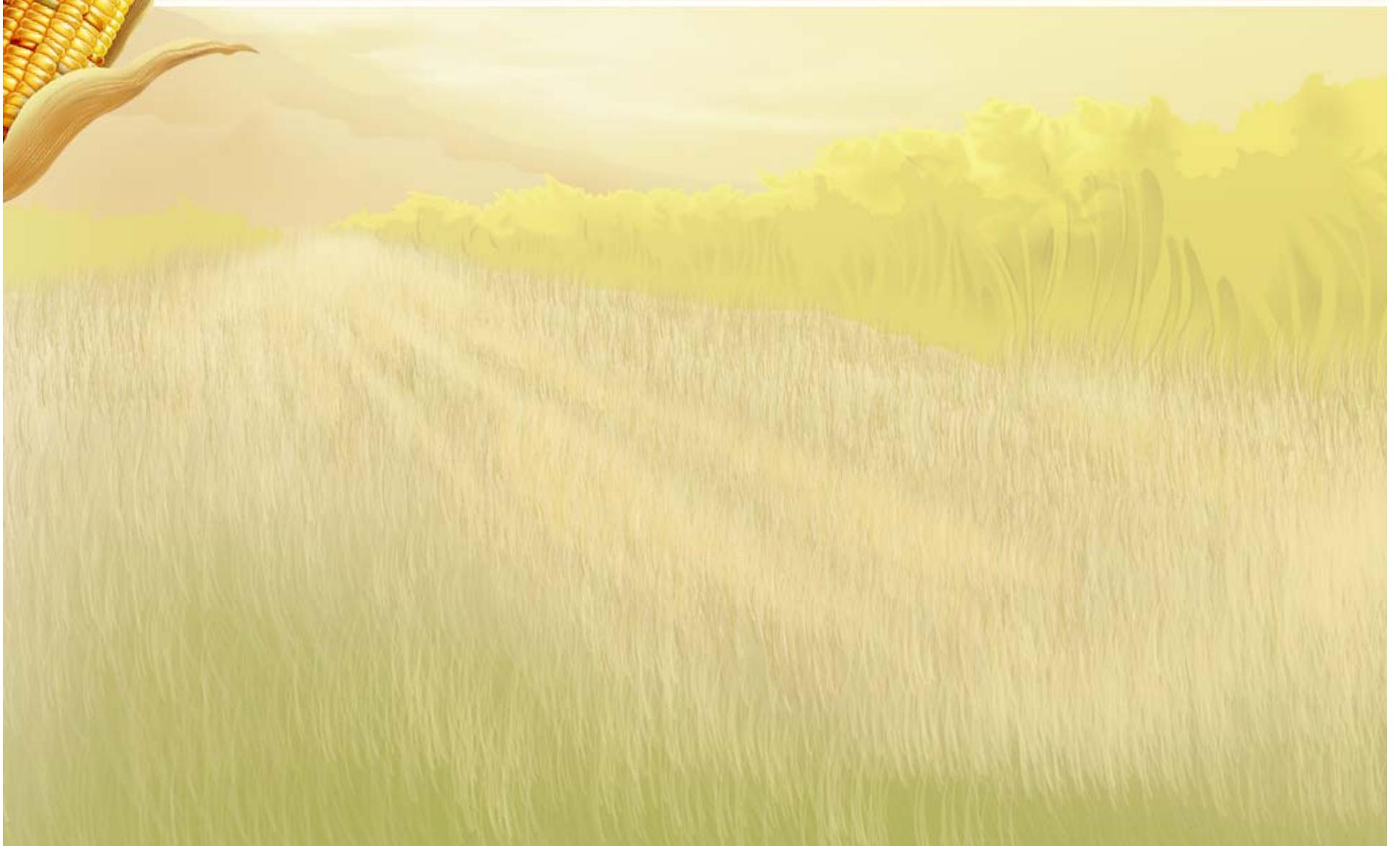
8. Sonication

L'emploi d'ultrasons. Elle est cependant limitée à de petits et moyens volumes.

9. Congélation et décongélation

Suite à une série de refroidissement brusque (congélation décongélation) la formation de cristaux entraîne la rupture de la paroi cellulaire. Cette technique est limitée à cause de son faible rendement et par la perte de l'activité de la biomolécule.

Purification





Purification

L'objectif principal est de disposer d'une méthode **spécifique** et **sensible** pour mesurer quantitativement par le biais de **l'activité catalytique**, l'enzyme particulière qui doit être isolée, et d'autre part trouver la **matière première d'approvisionnement la plus riche**. D'autres éléments doivent être pris en considération :



1. La connaissance des caractéristiques de la matière première ;
 - sa **nature** (liquide ou solide)
 - son **origine** (animale, végétale, microbienne),
 - sa **structure biologique** (cellulaire, tissulaire....)
2. La **localisation** du produit recherché (cytoplasme, mitochondrie, membranes.....)
3. Les propriétés **structurales** et **physicochimiques** (PM, organisation structurale, constantes cinétiques, stabilité moléculaire, pH optimum, point isoélectriques, inhibiteurs, activateurs..)



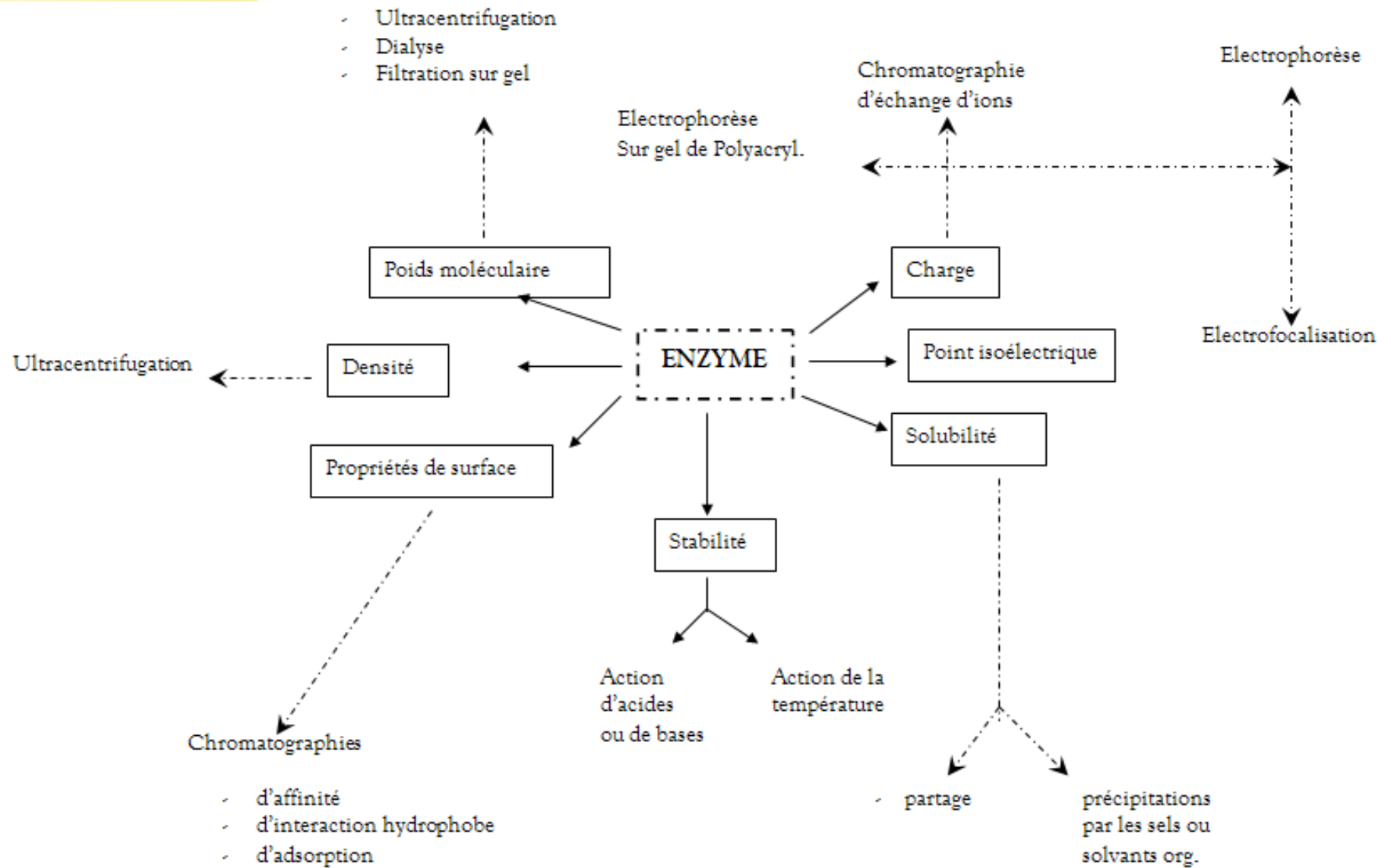
4. Il faut un procédé de libération de la protéine sous forme soluble, sans perte d'activité.
5. Pour ne pas détruire l'harmonie de l'édifice des enzymes on doit opérer généralement à **basse température** (+4°C, appareils réfrigérés, réactifs refroidis....), dans des milieux **tamponnés**, contenant des agents protecteurs, aussi **rapidement** et **soigneusement** que possible.

Bref !

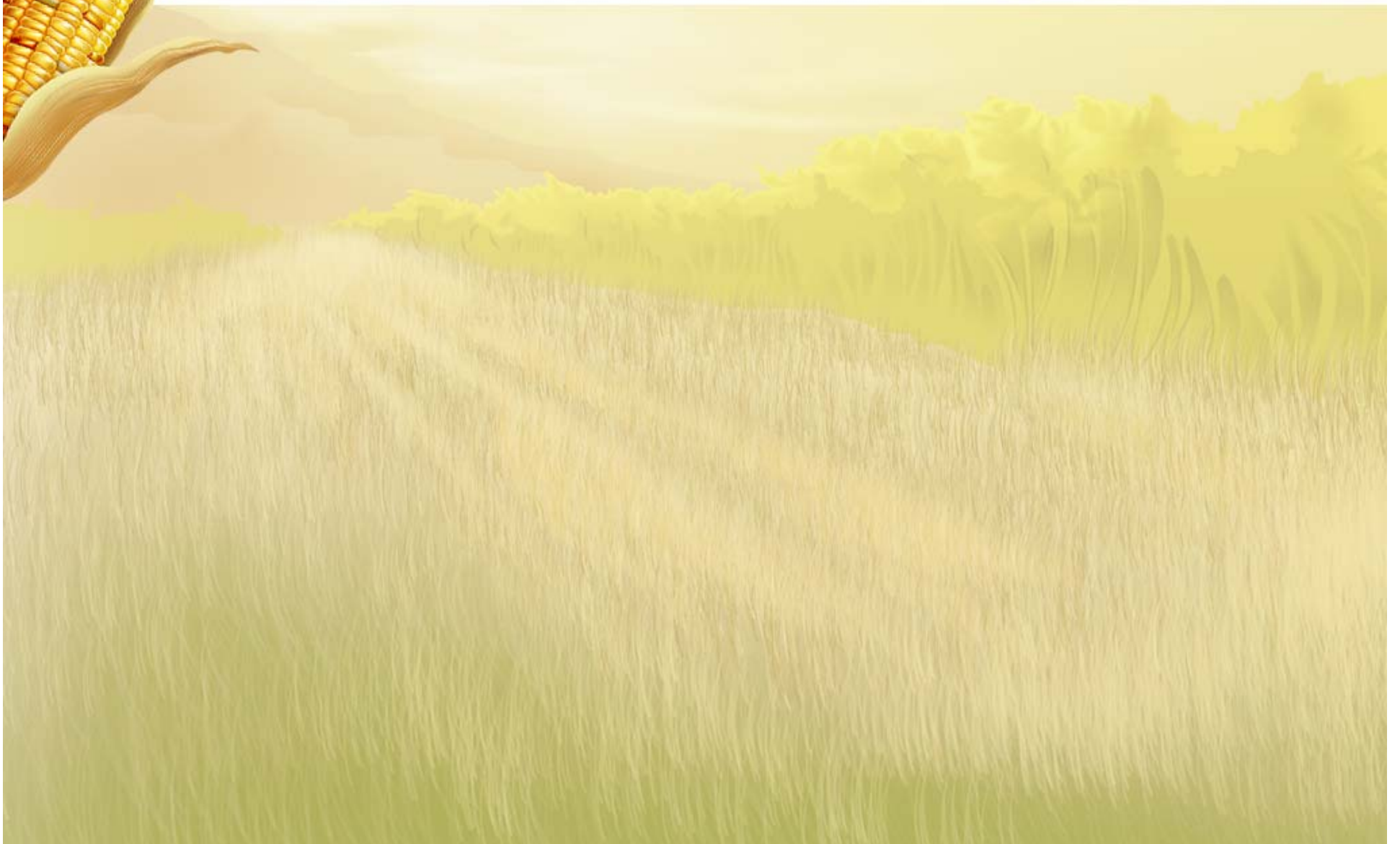
Dans la majorité des cas, la matière première de départ est extrêmement hétérogène et il est pratiquement impossible d'isoler une molécule suffisamment purifiée, en une seule étape. Donc il faut faire appel à la combinaison d'un certain nombre d'opérations successives.

Pour cela il existe une panoplie de techniques de séparation et de purification selon les propriétés globales des molécules à séparer (figure).





Techniques utilisées en Purification





Précipitation différentielle

1. Par les solvants organiques

L'addition en proportions définies de solvants organiques, tels que l'**acétone** ou l'**éthanol**, à une solution aqueuse tamponnée contenant un mélange protéique change la « *polarité* » du milieu et modifie de manière différente les **solubilités** des protéines.

Certaines deviennent insolubles et précipitent. Cette précipitation doit être réalisée à basse température (-20°C) pour éviter la dénaturation.



2. Par le sulfate d'ammonium

Les sels à fortes concentrations, entrent en compétition pour l'eau, solvant polaire, avec les protéines dont elles provoquent la **désolvation** ; ce qui entraîne leur précipitation : c'est le **relargage** ou « *Salting-out* ». La concentration en sel précipitante dépend de la nature de la protéine.

On utilise généralement le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sel neutre très soluble permettant d'obtenir des solutions de forces ioniques élevées.



3. Dialyse & Concentration

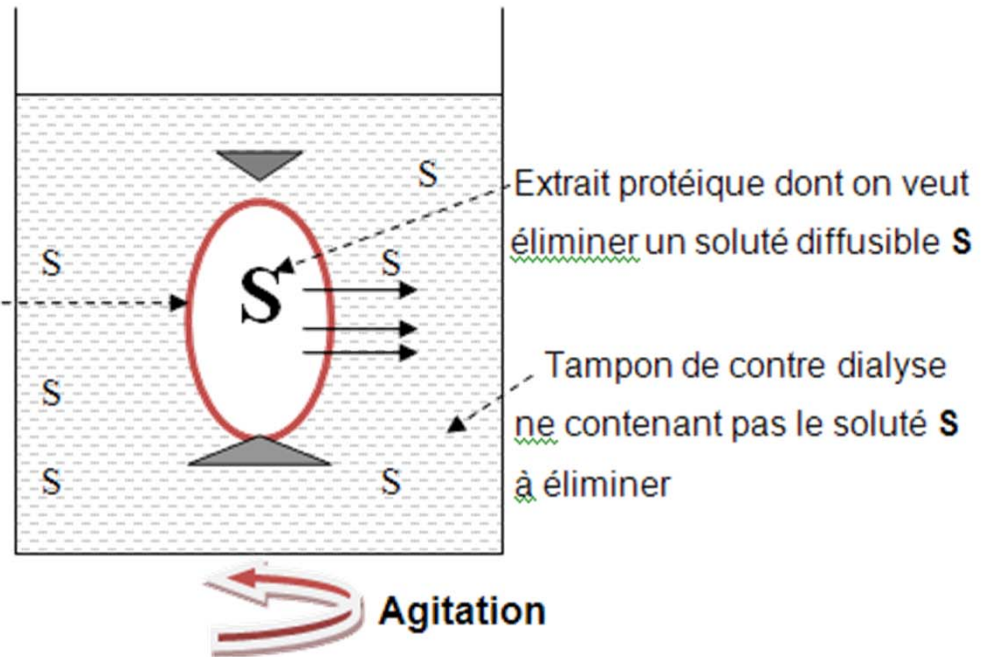
La dialyse est utilisée en cours de purification pour éliminer de l'extrait protéique les molécules diffusibles devenues indésirables : **Ex** le sulfate d'ammonium après précipitation différentielle.

L'extrait à dialyser est confiné dans un sac de dialyse constitué par une membrane hémiperméable. Le sac de dialyse est placé dans un tampon ne contenant pas le soluté à éliminer.



3.1 Dialyse

Sac de dialyse (membrane
Hémiperméable)





3.2 Concentration

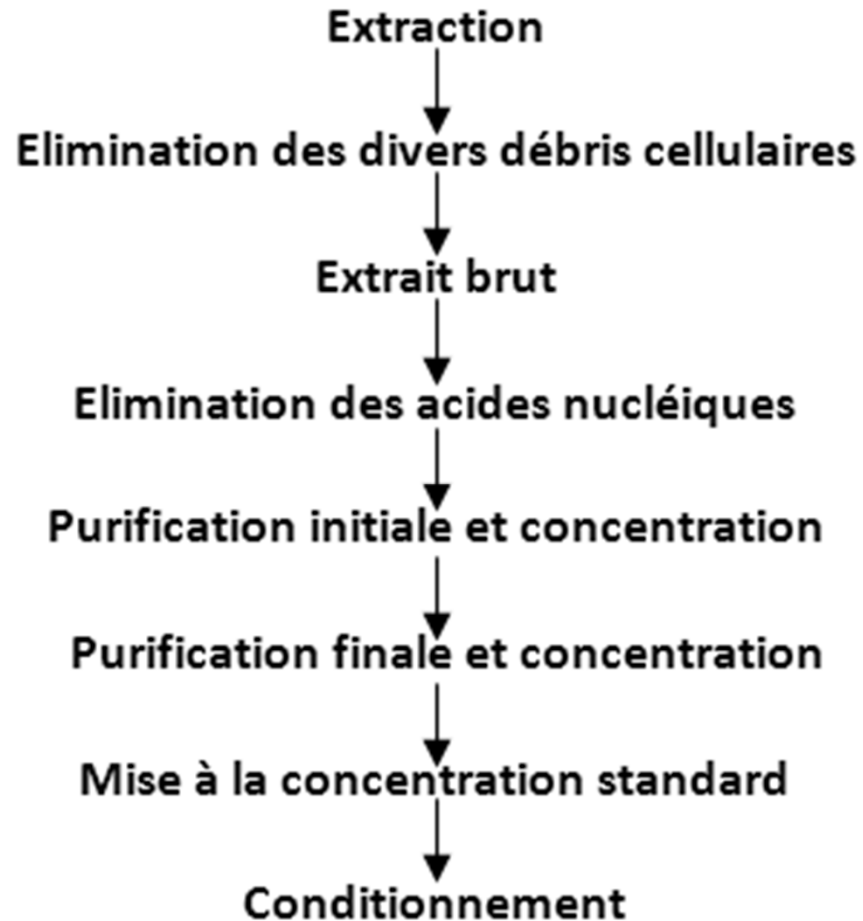
La concentration d'un extrait protéique peut s'avérer nécessaire par exemple après étape de chromatographie ayant entraînée une dilution importante de celui – ci.

Plusieurs systèmes de concentration sont disponibles commercialement, ils opèrent selon l'un des principes suivants :

- **Osmose inverse** : une différence de pression contre – balance la pression osmotique et fait sortir le solvant à travers une membrane hémiperméable qui retient les protéines
- **Ultrafiltration** : le solvant est entraîné à travers une membrane finement poreuse par pression ou centrifugation.
- **Evaporation sous vide.**



Les différentes étapes d'une extraction – purification





Extrait brut : est obtenu à la suite de l'élimination des corps et débris cellulaires après mise en œuvre d'une technique d'extraction. Cette élimination des corps cellulaires est obtenue soit par filtration, soit par centrifugation.

Elimination des acides nucléiques : est nécessaire si on a réalisé une destruction presque complète des structures cellulaires : ils sont responsable de l'augmentation de la viscosité du milieu ce qui rend le maniement des solutions plus difficile.



Volume mis en jeux

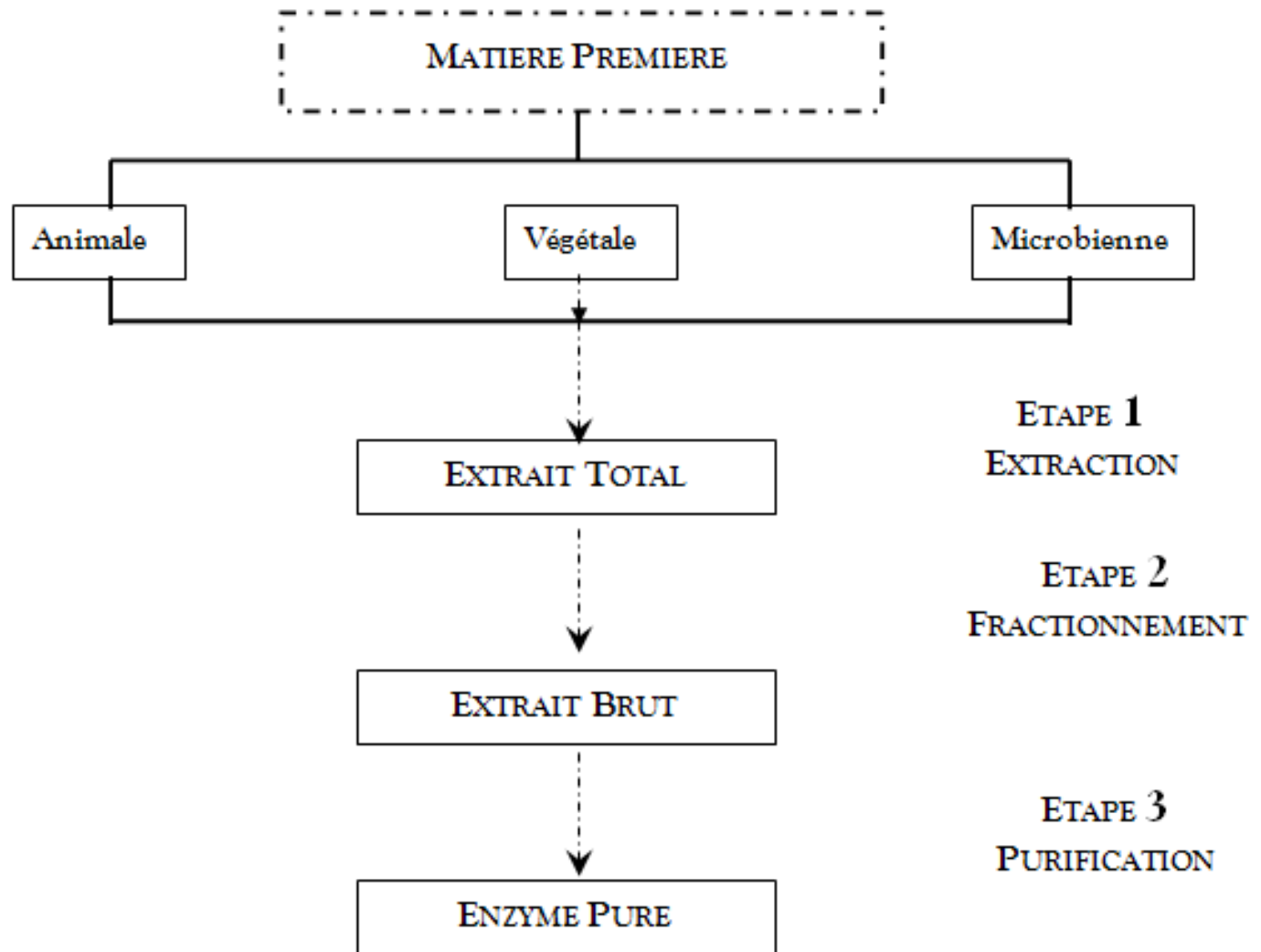
Toutes les méthodes classiques ne peuvent pas être mises en œuvre à grande échelle, ceci pour un certain nombre de raisons (économiques ou technologiques).

La première raison réside dans le coût de certains réactifs à mettre en œuvre, ou dans le temps de préparation, c'est-à-dire dans le coût de l'enzyme obtenue.



L'aspect technologique comprend plusieurs aspects :

- les volumes à mettre en œuvre sont plus importants qu'à l'échelle du laboratoire.
- Les récipients de grands volumes doivent contenir la matière biologique sans l'inactiver ni la dégrader ; le verre des récipients de laboratoire ne peut être utilisé pour de tels volumes ; on a recours à des cuves en acier inoxydable.
- Le passage des liquides d'une cuve à l'autre doit être suffisamment rapide : on a recours à des pompes ou à la gravité ; la vidange d'une cuve ne peut être une opération instantanée.



Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme



Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire.

La purification des enzymes met en jeu une ou plusieurs techniques de chromatographie en phase liquide. Elles sont récapitulées dans le tableau suivant :



Techniques chromatographiques

Techniques chromatographiques		Paramètres de séparation
Adsorption partage	en phase normale	polarité (<u>hydrophilicité</u>)
	en phase inversée ou chromatographie hydrophobe	<u>apolarité</u> (<u>hydrophobicité</u>)
Exclusion stérique (gel <u>perméation</u> ou gel filtration)		taille (masse moléculaire) forme
Echange d'ions		<u>pH</u> i ou charge à un pH donné
Affinité biologique		<u>Complexation</u> de ligand



1. Etude de la chromatographie d'échange d'ions

Un échangeur d'ions est une matrice insoluble sur laquelle des groupements ionisables ont été fixés par covalence. A ces groupes chargés sont associés des contre-ions qui peuvent être réversiblement échangés avec des ions de même charge.

Les échangeurs diffèrent en outre par la nature chimique du support, gel polysidique ou résine synthétique, et par la force acido-basique du groupement ionisé.

Les protéines d'un mélange à séparer possèdent des chaînes latérales ionisables en composition variables et donc des pH_i différents.



Etude de la chromatographie d'échange d'ions

Une séparation sur colonne comporte en général deux étapes :

- l'adsorption réversible sur l'échangeur d'ions de l'enzyme à purifier et des protéines de charges voisines ;
- la désorption différentielle des protéines adsorbées :
 - par modification du pH de l'éluant engendrant ainsi une modification de l'ionisation et donc de charge des protéines
 - par augmentation de la force ionique



Etude de la chromatographie d'échange d'ions

Les protéines les plus faiblement fixées seront éluées les premières.

NB. Il existe un autre procédé, il s'agit de l'utilisation de la chromatographie d'exclusion moléculaire qui permet de fractionner un mélange de protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Etude de la chromatographie d'échange d'ions

Résine échangeuse de cations (cationique) :

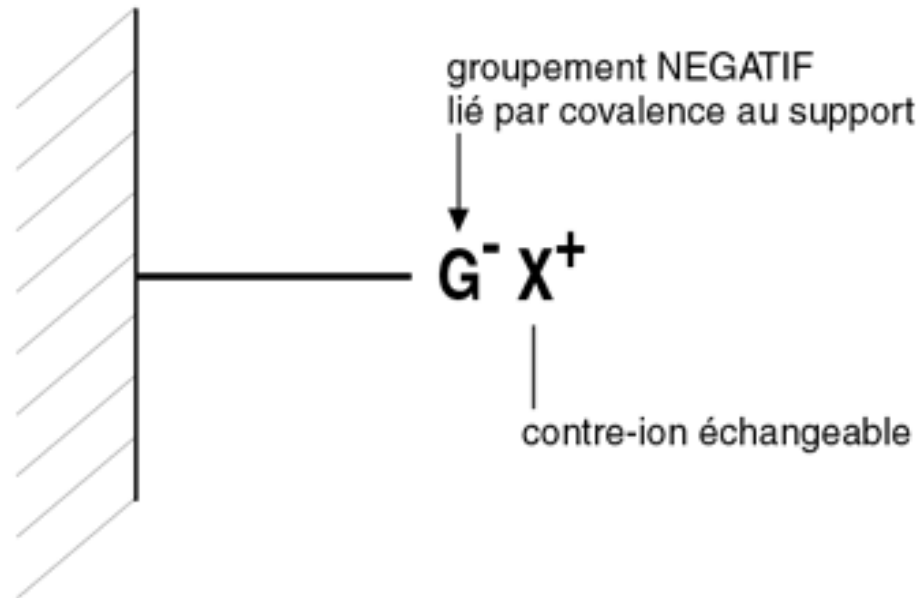


Figure : Résine échangeuse de cations (résine cationique).

Etude de la chromatographie d'échange d'ions

Résine échangeuse d'anions (anionique) :

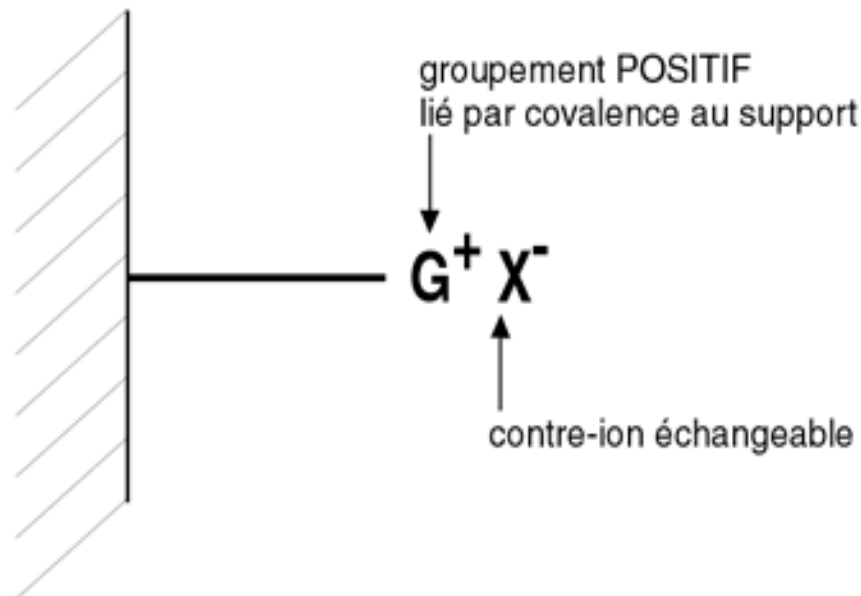
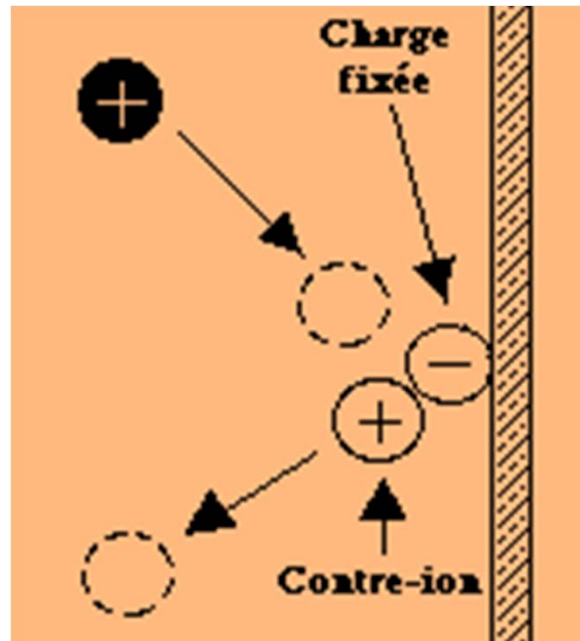


Figure : Résine échangeuse d'anions (résine anionique).

Etude de la chromatographie d'échange d'ions





La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne, mais la méthode peut être transposée sur couche mince. Du papier échangeur d'ions est également commercialisé . Enfin l'échange d'ions peut être réalisé en batch : la résine est mise en présence de la solution et agitée mécaniquement.

Propriétés des échangeurs d'ions : Le support peut être minéral, mais il est le plus souvent organique (résine de copolymérisation, polyosides : dextrans ou celluloses - voir au verso). Les groupements fonctionnels chargés des résines sont fixés par covalence sur le support.

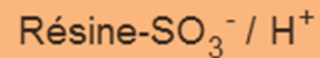


Les groupements fonctionnels des résines cationiques (résines classées d'après leurs aptitudes à l'ionisation) :

→ Résines cationiques fortes :

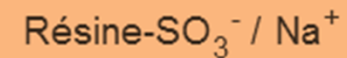
sulfoniques (très fortement ionisées, quel que soit le pH) :

Résine sous forme acide :



(contre-ion : H^+)

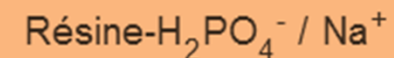
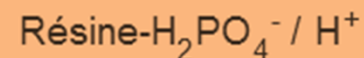
Résine sous forme sodique :



(contre-ion : Na^+)

→ Résines cationiques intermédiaire :

à groupement phospho :





→ **Résines cationiques faibles :**

1. carboxyliques (non ionisées en milieu fortement acide)

Résine-COO⁻ / H⁺

Résine-COO⁻ / Na⁺

2. carboxyliques (non ionisées en milieu fortement acide)

Résine-CH₂-COO⁻ / H⁺

Résine-CH₂-COO⁻ / Na⁺



Résines cationiques très faibles :

phénoliques (uniquement ionisées en milieu alcalin) :

Résine- O^- / H^+

Résine- O^- / Na^+

Capacité de rétention d'un échangeur d'ions : C'est le nombre de millimoles (mmol) d'ions que la résine peut échanger par unité de masse. On l'exprime par gramme de résine sèche (ou moins souvent par unité de volume : par ml de résine humide).

Elution : L'élution consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de chargé et de concentration plus élevée on utilise de petits ions fortement chargés : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...



Exemple de résine échangeuse d'ions :

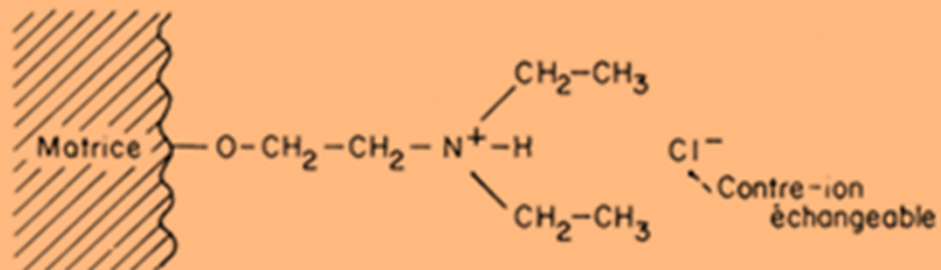
→ Les résines polyosidiques chargées de type Sephadex :

Ces échangeurs sont utilisés pour la séparation de macromolécules ionisées : protéines, acides nucléiques...

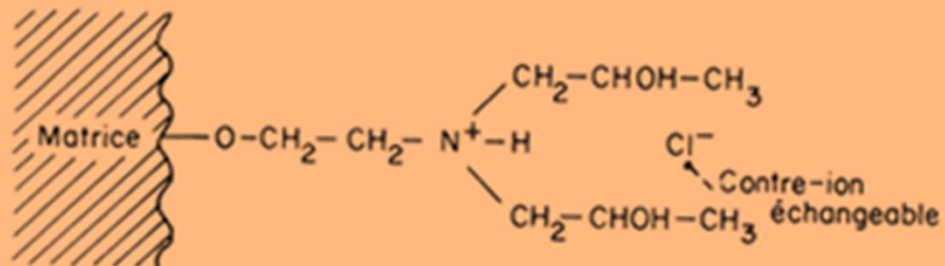
La matrice polyosidique (composée de cellulose ou de dextranses) porte les groupements chargés :

Echangeurs anioniques Sephadex :

– le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :

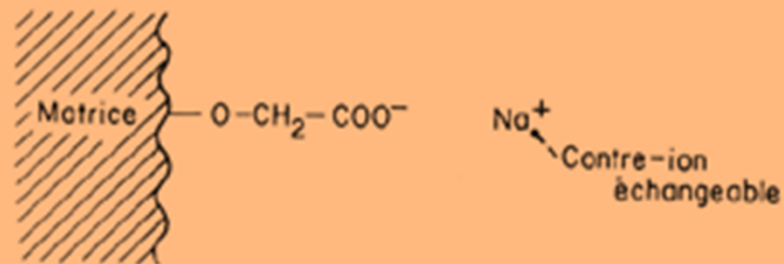


– le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :

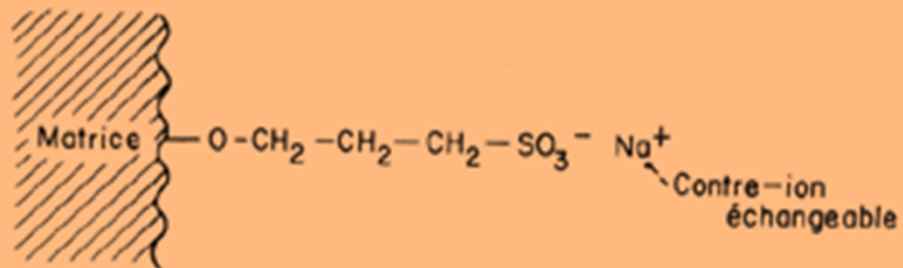


Echangeurs cationiques Sephadex :

– le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :

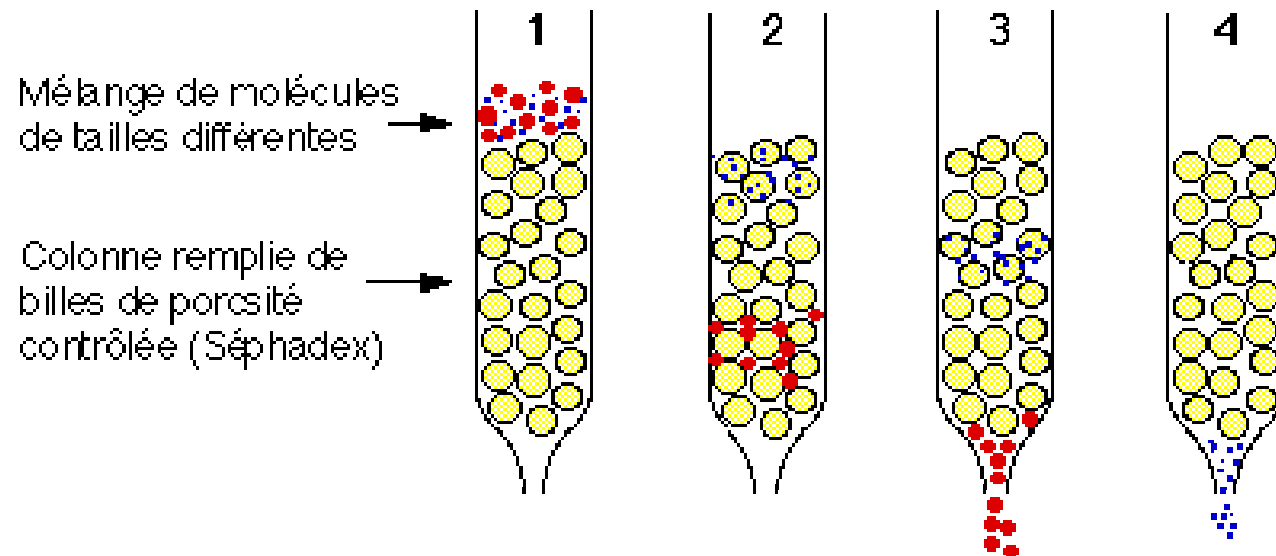


– le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :



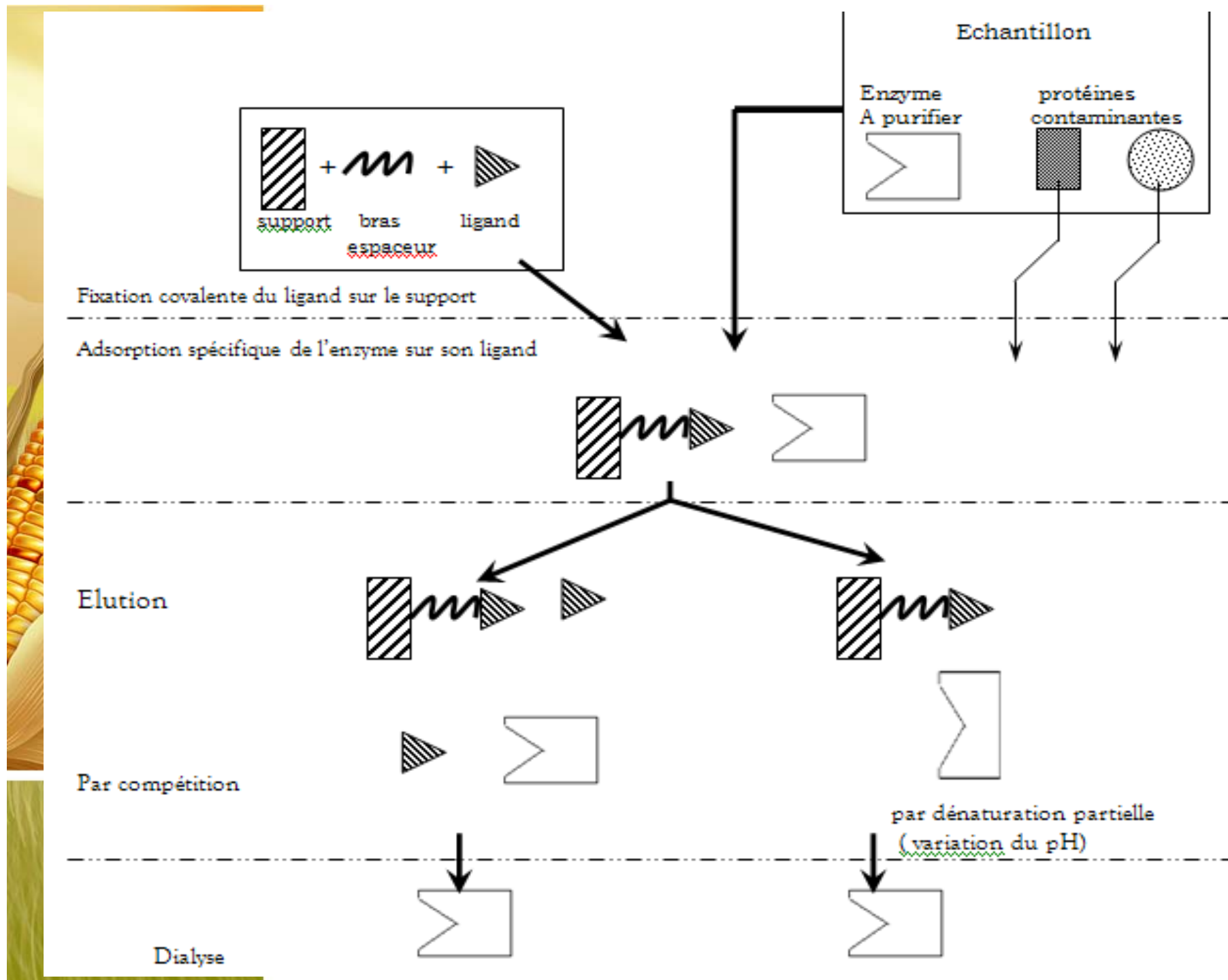


NB. Il existe un autre procédé, il s'agit de l'utilisation de la chromatographie d'exclusion moléculaire qui permet de fractionner un mélange de protéines en fonction de leur masse moléculaire.





CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ





Etapes

1. Phase stationnaire

La phase stationnaire est constituée d'un support macroporeux. Sur le support est fixé par covalence un ligand de la protéine à purifier, le plus souvent un analogue stérique du substrat non transformé par l'enzyme exemple : un thio- β D galactoside si l'on cherche à purifier la β galactosidase.

Un bras espaceur constitué par une chaîne hydrocarbonée bifonctionnelle permet d'éloigner le ligand du support, le rendant plus accessible au site actif de l'enzyme.



2. L'échantillon

L'échantillon contenant l'enzyme à purifier est déposé au sommet de la colonne. La phase mobile est d'abord un tampon préservant la structure spatiale de la protéine. L'enzyme recherchée est retenue spécifiquement sur la colonne parce qu'il forme un complexe stéréospécifique avec le ligand.

Après un lavage suffisant pour éliminer les autres protéines, l'enzyme recherchée peut être éluée car sa complexation avec le ligand est non covalente et réversible.



3. Le tampon d'élution

Soit contient un ligand (libre) de l'enzyme qui entre en compétition avec le ligand fixé.

Soit provoque, à cause de son pH_i une dénaturation partielle (réversible) de l'enzyme, et donc une déformation de son site actif.

Le ligand compétiteur (ou le tampon dénaturant) est ensuite éliminé généralement par dialyse.



Conclusion

La chromatographie d'affinité biologique est une technique de purification très performante, elle permet d'obtenir un enrichissement élevé en une seule étape chromatographique donc en peu de temps et avec un bon rendement.

Cependant la fixation du ligand et du bras espaceur sur le support est assez fastidieuse. Le support doit tout d'abord être activé avec le CNBr (Bromure de cyanogène).



LE SUIVI ET LE CONTRÔLE DE LA PURIFICATION



LES GRANDEURS MESURÉES

1. **L' Activité Spécifique (AS)** représente le rapport de la quantité d'enzyme exprimé par un nombre d'unités à l'unité de masse de protéines, permet d'évaluer le degré de pureté d'une enzyme.

L'AS d'un enzyme est la quantité de produit (en μmoles) formé par unité de temps (en général la minute) par mg de protéine. C'est une mesure du degré de pureté de l' enzyme. Sa valeur augmente au cours de la purification et atteint une valeur maximale quand l' enzyme est pure.

$$\rightarrow AS = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$$
$$U/\text{mg}$$



LES GRANDEURS MESURÉES

2. L'Enrichissement (F) ou taux de purification est le rapport de l'activité spécifique finale sur l'activité spécifique initiale :

$$F = \frac{AS1}{AS0} (>1)$$



LES GRANDEURS MESURÉES

3. L' Activité Totale (AT) d'un extrait enzymatique est exprimée par le nombre d'enzymes présent dans la totalité du volume d'extrait. Sa détermination permet d'apprécier les pertes d'enzymes inévitables lors de la purification.

4. Le rendement (R): exprimé en pourcentage (%) quantifie ces pertes

$$R = \frac{AT1}{AT0} * 100 \quad (\leq 100)$$



L'idéal lors d'une purification est d'obtenir l'enrichissement (F) le plus grand possible avec le meilleur rendement (R).



LES GRANDEURS MESURÉES

3. L' Activité Totale (AT) d'un extrait enzymatique est exprimée par le nombre d'enzymes présent dans la totalité du volume d'extrait. Sa détermination permet d'apprécier les pertes d'enzymes inévitables lors de la purification.

4. Le rendement (R): exprimé en pourcentage (%) quantifie ces pertes

$$R = \frac{AT1}{AT0} * 100 \quad (\leq 100)$$